

Eur päisches
PatentamtEuropean
Patent OfficeOffice européen
des brevetsEPO-Munich
52

26. April 2000

EP00/ 3347

Bescheinigung

Certificate

Attestation

REC'D 15 MAY 2000

WIPO

PCT

Die angehefteten Unterla-
gen stimmen mit der
ursprünglich eingereichten
Fassung der auf dem näch-
sten Blatt bezeichneten
europäischen Patentanmel-
dung überein.

The attached documents
are exact copies of the
European patent application
described on the following
page, as originally filed.

Les documents fixés à
cette attestation sont
conformes à la version
initialement déposée de
la demande de brevet
européen spécifiée à la
page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

99107199.4

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

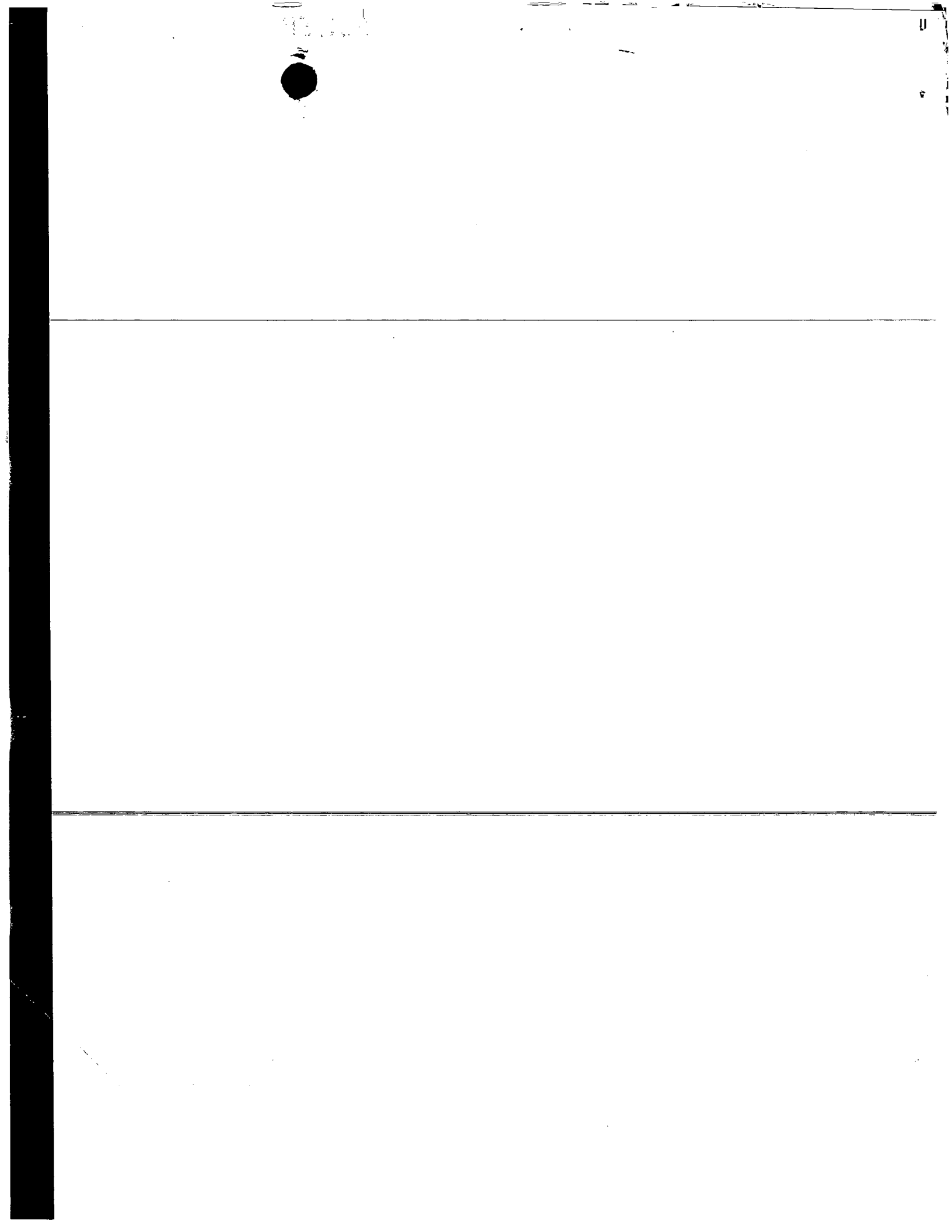
For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

I.L.C. HATTEN-HECKMAN

DEN HAAG, DEN
THE HAGUE,
LA HAYE, LE

05/04/00





Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

Blatt 2 der Bescheinigung
Sheet 2 of the certificate
Page 2 de l'attestation

Anmeldung Nr.:
Application no.: 99107199.4
Demande n°:

Anmeldetag:
Date of filing: 13/04/99
Date de dépôt:

Anmelder:
Applicant(s):
Demandeur(s):
Willex Biotechnology GmbH
81675 München
GERMANY

Bezeichnung der Erfindung:
Title of the invention:
Titre de l'invention:

Diagnostischer und therapeutischer Einsatz von Antikörpern gegen den Urokinase-Rezeptor

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat:
State:
Pays:

Tag:
Date:
Date:

Aktenzeichen:
File no.
Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation:
International Patent classification:
Classification internationale des brevets:

G01N33/574, G01N33/577, G01N33/68, A61K39/395, A61K47/48, A61K51/10, C12N15/13, C07K16/28, C07K19/00

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten:
Contracting states designated at date of filing: AT/BE/CH/CY/DE/DK/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NL/PT/SE
Etats contractants désignés lors du dépôt:

Bemerkungen:
Remarks:
Remarques:

04-1999

EP99107199.4

DESC

PATENTANWÄLTE

Eur pean Patent Attorneys
Eur pean Trade Mark Attorneys

DIPL.-ING. H. WEICKMANN
DIPL.-ING. F. A. WEICKMANN
DIPL.-CHEM. B. HUBER
DR.-ING. H. LISKA
DIPL.-PHYS. DR. J. PRECHTEL
DIPL.-CHEM. DR. B. BÖHM
DIPL.-CHEM. DR. W. WEISS
DIPL.-PHYS. DR. J. TIESMEYER
DIPL.-PHYS. DR. M. HERZOG
DIPL.-PHYS. B. RUTTENSBERGER

POSTFACH 860 820
81635 MÜNCHEN

KOPERNIKUSSTRASSE 9
81679 MÜNCHEN

TELEFON (089) 4 55 63-0

TELEX 5 22 621

TELEFAX (089) 4 70 50 68

E-MAIL email@weickmann.de

13. April 1999

Unser Zeichen:
19116P EP/WWvo

Anmelder:
Wilex Biotechnology GmbH
Grillparzerstraße 10B

81675 München
DE

EPO - Munich
50

13. April 1999

Diagnostischer und therapeutischer Einsatz von Antikörpern gegen den
Urokinase-Rezeptor

Diagnostischer und therapeutischer Einsatz von Antikörpern gegen den Urokinase-Rezeptor.

5

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und einen Reagenzienkit zum Nachweis von Zellen in einer biologischen Probe unter Verwendung einer Doppelfluoreszenztechnik.

10

Der zuverlässige Nachweis von verstreuten Tumorzellen, die aus dem soliden Gewebeverband ausgebrochen sind (Mikrometastasen), ist für die Tumordiagnostik und Therapie von großer Bedeutung. Im Laufe der vergangenen Jahre wurden deshalb verschiedene Verfahren entwickelt, um solche einzelnen verstreuten Tumorzellen in Körperflüssigkeiten oder Gewebeproben nachzuweisen. Der Nachweis kann z.B. durch selektive Markierung der seltenen Zellen mittels immunzytochemischer Methoden erfolgen, wobei häufig enzymatische Markierungsgruppen wie Alkalische Phosphatase eingesetzt werden. Auch Doppelmarkierungstechniken sind

20

Die Veröffentlichung Schlimok et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 8672-8676) beschreibt den Nachweis von mikrometastatischen Tumorzellen in Knochenmark mittels einer Doppelmarkierungstechnik, wobei ein für Zellen epidermalen Ursprungs spezifischer Cytokeratin 18-Antikörper und ein Leukozyten-Antikörper verwendet werden. Dabei werden Alkalische Phosphatase und eine radioaktive Markierungsgruppe (^{125}I) eingesetzt. Da die Verwendung radioaktiver Markierungsgruppen mit Nachteilen behaftet ist, eignet sich diese Methode nicht für die klinische Praxis.

30

Funk et al. (Int. J. Cancer 65 (1996), 755-761) beschreiben den Nachweis von Mikrometastasen in Knochenmark mittels einer Doppelmarkierungs-

technik unter Verwendung eines Cytokeratin 18-Antikörpers und eines E-Cadherin-Antikörpers. Beide Antikörper werden über Alkalische Phosphatase als enzymatische Markierungsgruppe und zwei unterschiedlich gefärbte chromogene Substrate nachgewiesen. Der sequenzielle Nachweis beider Antikörper mittels unterschiedlicher chromogener Substrate ist jedoch umständlich und deshalb für die klinische Praxis wenig geeignet.

Hiss und Mitarbeiter (Heiss et al., Nature Med. 1 (1995), 1035-1039 und

~~Allgayer et al., J. Histochem. Cytochem. 45 (1997), 203-212) weisen~~

10 verstreute Tumorzellen in Knochenmark über eine Doppelmarkierungs-

methode basierend auf dem gleichzeitigen Nachweis von Cytokeratin 18

und dem uPA-Rezeptor (uPAR) nach. Hierzu werden auf einem Objektträger

gebundene, fixierte Zellen mit einem biotinylierten Cytokeratin-spezifischen

Antikörper und anschließend mit einem Konjugat aus Alkalischer Phospha-

15 tase und Streptavidin inkubiert. Mittels der immobilisierten Alkalischen

Phosphatase und einem chromogenen Substrat wird eine enzymatische

Färbereaktion durchgeführt, wobei eine dunkelrote Färbung entsteht.

Zusätzlich wird ein monoklonaler Antikörper gegen uPAR eingesetzt, der mit

20 einem goldkonjugierten Sekundäntikörper markiert und anschließend einer

Silber-Verstärkungsreaktion unterzogen wird, wobei eine schwarze Färbung

resultiert. Die Objektträger werden dann auf die Färbungen (dunkelrot/-

schwarz) manuell und visuell unter dem Mikroskop durchgemustert, wobei

eine Doppelfärbung extrem schwer zu detektieren ist.

25 Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand darin, ein

Verfahren zum Nachweis von Zellen, insbesondere von selten vorkom-

menden Zellen wie Tumorzellen in einer biologischen Probe, z.B. Knochen-

mark, durchzuführen, bei dem die Nachteile des Standes der Technik

mindestens teilweise beseitigt sind. Insbesondere soll das Verfahren

gleichzeitig eine hohe Sensitivität und eine problemlose Auswertbarkeit

ermöglichen.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zum Nachweis von Zellen in einer biologischen Probe, das folgende Schritte umfaßt:

- (a) Bereitstellen einer zu testenden Probe,
- (b) Inkubieren der Probe mit mindestens zwei verschiedenen, die nachzuweisenden Zellen erkennenden Bindemolekülen, wobei die Bindemoleküle mit jeweils verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden, und
- (c) Bestimmen der Fluoreszenzmarkierungen in der auf einer Festphase fixierten Probe.

10

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich zum Nachweis selten vorkommender Zellen in einer fixierten biologischen Probe. "Selten vorkommend" im Sinne der vorliegenden Erfindung bedeutet dabei, daß die erwartete Häufigkeit der nachzuweisenden Zellen im Bereich von $1:10^4$ bis $1:10^7$ der gesamten in der zu testenden Probe vorhandenen Zellen ist. Beispiele für solche selten vorkommenden Zellen sind Tumorzellen in einer Blut- oder Knochenmarkspröbe. Bei entsprechender Auswahl von zellspezifischen Determinanten und dagegen gerichteten Bindemolekülen können selbstverständlich auch andere Arten selten vorkommender Zellen nachgewiesen werden.

20

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht aufgrund der Doppelfluoreszenz-Färbetechnik eine schnelle und genaue Identifizierung der nachzuweisenden Zellen. Außerdem können bei Verwendung unterschiedlicher, vorzugsweise nebeneinander nachweisbarer Fluoreszenzmarkierungen in

25

sowie auf der Zelle kolokalisierte Antigene (wie z.B. Cytokeratin 8/18, p53, PAI-2 und insbesondere der Urokinase-Rezeptor uPAR) analysiert werden. Dies ist bisher mit bekannten Methoden insbesondere bei Gewebepreparaten wie Knochenmarkaspiraten sehr schwierig gewesen. Ein weiterer großer Vorteil der neu entwickelten Methode ist die Möglichkeit, die Anzahl und Intensität fluoreszierender Zellen quantitativ zu bestimmen, beispielsweise mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop.

30

- 4 -

Schritt (a) des erfindungsgemäßen Verfahrens umfaßt das Bereitstellen einer zu testenden biologischen Probe. Hierzu wird eine Probe dem Patienten, z.B. aus einer Körperflüssigkeit wie etwa Blut oder aus einem Gewebe wie etwa Knochenmark entnommen. Besonders bevorzugt wird das erfindungsgemäße

Verfahren zum Nachweis verstreuter Tumorzellen epidermalen Ursprungs im Knochenmark verwendet. Dabei kann das Knochenmark aus dem Beckenkammknochen entnommen werden. In der Probe werden dann vorzugsweise mononukleäre Zellen einschließlich Tumorzellen angereichert. Diese Anreicherung kann nach bekannten Methoden beispielsweise durch Dichtegradienten-Zentrifugation, z.B. Ficoll, erfolgen, wobei eine Abtrennung von Erythrozyten und Granulozyten stattfindet.

Die zu testende Probe enthält vorzugsweise mindestens 10^6 Zellen, um einen zuverlässigen Nachweis seltener Zellen zu ermöglichen. Besonders bevorzugt enthält die Probe 10^6 bis 10^9 , insbesondere 5×10^6 bis 5×10^7 Zellen.

Gemäß Schritt (b) wird die Probe mit mindestens zwei verschiedenen, gegen die nachzuweisenden Zellen gerichteten Bindemolekülen in Kontakt gebracht. Die Bindemoleküle sind vorzugsweise Antikörper oder Antikörperfragmente, insbesondere monoklonale Antikörper oder Antikörperfragmente.

Darüber hinaus können jedoch auch Liganden von in den nachzuweisenden Zellen spezifisch vorhandenen Rezeptoren, z.B. dem uPA-Rezeptor, verwendet werden. Beispiele solcher Liganden sind lineare oder/und zyklische Peptide oder Peptidmimetika, die eine Fluoreszenzmarkierung tragen können.

Das Inkontaktbringen der Probe mit den fluoreszenzmarkierten Bindemolekülen erfolgt vorzugsweise nach Fixierung der Zellen auf eine Festphase. Diese Fixierung kann nach bekannten Methoden, z.B. mit Formaldehyd oder Glutardialdehyd, erfolgen. Als Festphase kann beispielsweise ein Objektträger verwendet werden.

- 5 -

Sofern erforderlich, können die in der zu testenden Probe vorliegende Zellen unter Verwendung eines Detergens, z.B. eines Saponins, permeabilisiert werden. Auf diese Weise können die Bindemoleküle auch an intrazellulär lokalisierte Determinanten binden.

5

Beim Nachweis von Tumorzellen sind die Bindemoleküle gegen Determinanten gerichtet, die in der zu testenden Probe nur oder in erhöhter Konzentration in Tumorzellen, aber nicht oder nur in geringer Konzentration in normalen Zellen vorkommen. Vorzugsweise wird als erste Determinante eine Struktur aus dem Inneren der Zellen, z.B. ein Cytokeratin, ausgewählt. Cytokeratine sind für Epithelzellen spezifische Bestandteile des Cytoskeletts und werden in mononukleären Blut- oder Knochenmarkszellen, die mesenchymalen Ursprungs sind, nicht exprimiert. Die Anwesenheit von Cytokeratinen in Zellen, die aus Blut- und Knochenmark entnommen wurden, weist somit auf das Vorhandensein epithelialer Tumorzellen hin. Beispiele für geeignete Anti-Cytokeratin-Antikörper sind der Antikörper A45B/B3 (Micromet GmbH, München, Deutschland) oder der Antikörper CK2 (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland). Weitere gegen intrazelluläre tumorassoziierte Antigene gerichteten Nachweisantikörper sind bekannt und kommerziell von verschiedenen Firmen erhältlich.

Als zweite Determinante wird vorzugsweise eine Struktur auf der Zelloberfläche ausgewählt, z.B. ein membranständiger Rezeptor. Eine besonders bevorzugte tumorspezifische Determinante ist der Urokinaserezeptor (uPAR). Der Nachweis dieses Rezeptors kann beispielsweise unter Verwendung von Anti-uPAR-Antikörpern wie etwa IID7 und IIIF10 (Luther et al., Am. J. Path. 150 (1997), 1231-1244) erfolgen. Vorzugsweise werden solche Anti-uPAR-Antikörper ausgewählt, die eine mindestens vergleichbare Affinität für einen Tumorzellen-spezifischen uPAR aufweisen, wie für einen uPAR aus "normalen" Zellen. Beispiele für solche auch Tumorzellen mit hoher Affinität bindende Anti-uPAR-Antikörper sind Antikörper, die das Epitop 52-60 von uPAR erkennen wie etwa der bereits oben genannte Antikörper IIIF10.

- 6 -

Andere Anti-uPAR-Antikörper erkennen hingegen uPAR auf Tumorzellen oftmals nur schlecht.

Andererseits kann der Nachweis von uPAR auch mit Fluoreszenz-markierten Rezeptorliganden, z.B. Urokinase, Urokinasefragmenten oder Urokinase-Peptiden erfolgen. Derartige Nachweismethoden sind beispielsweise von Chucholowski et al. (Fibrinolysis 6, Suppl. 4 (1992), 95-102), Ciccocioppo et al. (J. Histochem. Cytochem. 45 (1997), 1307-1313) und Luther et al. (Am. J. Pat. 150 (1997), 1231-1242) beschrieben.

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden mindestens zwei verschiedene Fluoreszenzmarkierungsgruppen verwendet. Günstigerweise werden solche Fluoreszenzmarkierungsgruppen eingesetzt, die voneinander unterscheidbare Emissionsspektren besitzen (z.B. rot/grün). Beispiele für geeignete Fluoreszenzfarbstoffe sind Fluorescein und Derivate davon, Phycoerythrin, Rhodamin, TRITC-Amine, Texas Red®-Amine, CY3 und CY5 sowie Alexa® 488 und Alexa® 568 (Molecular Probes). Die Fluoreszenzfarbstoffe können direkt, z.B. kovalent, mit den primären, für die nachzuweisende Zellen spezifischen Bindemolekülen konjugiert werden. In diesem Fall spricht man von einer Direktmarkierung. Andererseits können die Fluoreszenzfarbstoffe an sekundäre Bindemoleküle konjugiert werden, welche ihrerseits gegen die primären Bindemoleküle gerichtet sind. In diesem Fall spricht man von einer Indirektmarkierung. Beide Markierungsmethoden, bzw. Kombinationen davon können beim erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden.

Die verschiedenen Bindemoleküle können mit der Zelle sequenziell oder parallel inkubiert werden. Eine parallele Inkubation mit mehreren Bindemolekülen (primäre Bindemoleküle und gegebenenfalls sekundäre Bindemoleküle bei Indirektmarkierung) führt zu einer erheblichen Zeitersparnis.

Die Auswertung der Probe erfolgt durch Bestimmung der Fluoreszenz nach Anregung der Fluoreszenzmarkierungsgruppen. Besonders bevorzugt wird

- 7 -

hierfür ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop oder ein Fluoreszenzmikroskop verwendet, welches eine Auswertung der Probe durch parallele oder/und sequenzielle Bestimmung der verschiedenen Fluoreszenzmarkierungsgruppen ermöglicht.

5

Die erfindungsgemäße Doppelfluoreszenz-Markierungstechnik ermöglicht darüber hinaus eine Charakterisierung der durch Reaktion mit den Bindemolekülen als positiv identifizierten Zellen. Diese Charakterisierung kann eine ortsspezifische oder/und quantitative Auswertung der Markierung umfassen.
10 So kann ein "Scannen" von einzelnen Zellen durch Bestimmung der Markierung in mehreren, z.B. 10 bis 50, Schnittebenen durch die Zelle in Abständen von beispielsweise 0,1 bis 1 μm erfolgen. Zusätzlich kann anhand einer Standardkurve, die durch die Messung von Mikropartikeln definierter Größe und definierter Menge an Fluoreszenzfarbstoff erstellt wurde, auch eine quantitative Bestimmung der mit den Bindemolekülen
15 reagierenden Determinanten in der Zelle durchgeführt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt die Gewinnung wertvoller diagnostischer Daten an Tumorpatienten und ermöglicht daher eine sensitiv
20 Prognosestellung für den Patienten nach Operation eines Primärtumors.

Schließlich betrifft die Erfindung ein Reagenzienkit zum Nachweis von Zellen in einer biologischen Probe umfassend

- 25 (a) ein erstes, die nachzuweisenden Zellen erkennendes Bindemolekül und eine erste Fluoreszenz-Markierungsgruppe,
- (b) ein zweites, die nachzuweisenden Zellen erkennendes Bindemolekül und eine zweite Fluoreszenz-Markierungsgruppe, wobei das erste und das zweite Bindemolekül und die erste und die zweite Fluoreszenz-Markierungsgruppe verschieden sind und
- 30 (c) Mittel zur Fixierung von Zellen auf einer Festphase.

- 8 -

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß uPAR-Antikörper, die gegen das Epitop 52-60 von uPAR gerichtet sind, einen uPAR mit einer in Tumorzellen vorkommenden Glykostruktur erkennen, d.h. mit mindestens vergleichbarer Affinität an einen von Tumorzellen exprimierten uPAR wie an einen von Normalzellen exprimierten uPAR binden. Andere Anti-uPAR-Antikörper z.B. HD13.1 (Todd et al., CD87 workshop panel report. In: Kishimoto T. et. al., Hrsg., Leucocyte Typing VI, New York & London, Garland Publishing, Inc. 1997; 1016-1020) besitzen hingegen nur eine geringe Affinität für uPAR aus Tumorzellen.

Die Erfindung betrifft somit die Verwendung eines Antikörpers oder eines antigenbindenden Fragments davon (vorzugsweise eines monoklonalen Antikörpers oder eines antigenbindenden Fragments davon), der gegen das Epitop 52 bis 60 von uPAR gerichtet ist, zur Herstellung eines gegen uPAR auf Tumorzellen gerichteten diagnostischen oder therapeutischen Mittels. Derartige Antikörper wie etwa der bekannte monoklonale Antikörper IIIF10 (Luther et. al. (1997), supra) oder Antikörper mit äquivalenter Bindespezifität, wie etwa chimärisierte oder humanisierte Antikörper oder entsprechende rekombinante oder proteolytische Antikörperfragmente, z.B. einzelkettige Antikörper-Fragmente, erkennen einen von Tumorzellen exprimierten uPAR mit einer für diagnostische und therapeutische Zwecke ausreichenden Affinität.

Weiterhin wurde überraschend festgestellt, daß derartige Antikörper oder Fragmente davon als diagnostisches Mittel zur Prognose des Verlaufs bei malignen Erkrankungen, insbesondere bei Tumoren, z.B. Mammakarzinomen, eingesetzt werden können. In Tumorproben von über 200 untersuchten Mamakarzinompatientinnen wurde gefunden, daß die Bindung des Antikörpers IIIF10 oder eines entsprechenden Antikörpers mit äquivalenter Bindefähigkeit eine signifikante prognostische Relevanz für den Krankheitsverlauf, d.h. Rezidivfreiheit bzw. Versterben aufweist. Dabei bedeuten hohe Antigenwerte eine kürzere Rezidivfreiheit bzw. früheres Versterben. Mit

- 9 -

Antikörpern, die gegen andere Regionen von uPAR gerichtet sind, konnte eine derartige prognostische Signifikanz nicht gefunden werden.

5 Aufgrund der hohen Affinität zu Tumor-uPAR eignen sich diese Antikörper oder Fragmente davon auch als diagnostische Mittel zum Nachweis von Tumorzellen in einer biologischen Proben, insbesondere zum Nachweis von verstreuten Tumorzellen in Knochenmark. Derartige Nachweisverfahren können beispielsweise als ELISA oder als - zuvor im Detail erläutertes - Doppelfluoreszenz-Nachweisverfahren durchgeführt werden.

10

Darüberhinaus sind Antikörper, die gegen das Epitop 52 bis 60 von uPAR gerichtet sind, oder deren Fragmente zur Herstellung eines therapeutischen Mittels geeignet, welches beispielsweise eine selektive Funktionsblockierung bei Tumorzellen bewirken kann. Darüberhinaus können die Antikörper oder
15 deren Fragmente in Form von Konjugaten mit einer cytotoxischen Gruppe zur Wachstumshemmung oder Abtötung von Tumorzellen eingesetzt werden. Beispiele für geeignete cytotoxische Gruppen sind radioaktive Gruppen, Toxine und Zellwachstumsinhibitoren. Für therapeutische Zweck werden vorzugsweise chimäre Antikörper mit humanisierten konstanten
20 Domänen eingesetzt, deren Herstellung beispielsweise in EP-B-O 120 694 beschrieben ist.

Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind rekombinante Nukleinsäuren, die für ein Polypeptid mit Antikörpereigenschaften kodieren und
25 die CDR3-VH-Sequenz oder/und die CDR3-VL-Sequenz des Antikörpers III F10 umfassen. Die CDR3-Region der VH-cDNA ist in SEQ ID NO. 1/2 von Nukleotid 295 bis 321 (entsprechend Aminosäure 99 bis 107) dargestellt. Die CDR3-Region der VL-cDNA ist in SEQ ID NO. 3/4 von Nukleotid 265 bis 291 (Aminosäure 89 bis 97) dargestellt. Weiterhin enthalten die Nu-
30 kleinsäuren vorzugsweise die für die CDR1- und/oder CDR2-Regionen kodierenden Abschnitt der VH- oder/und VL-cDNA. Die Sequenz n für die CDR1-VH-Region sind in SEQ ID NO. 1/2 von Nukleotid 91 bis 105

- 10 -

(entsprechend Aminosäure 31 bis 35, d.h. SYDIN) angegeben. In SEQ ID NO. 3/4 reicht die CDR1-Region der VL-cDNA von Nukleotid 70 bis 102 (entsprechend Aminosäure 24 bis 34, d.h. KAS...TVA). Die CDR2-Region der VH-cDNA reicht von Nukleotid 148 bis 198 (Aminosäure 50 bis 66, d.h. WIF...FKD) in SEQ ID NO. 1/2. Die CDR2-Region der VL-cDNA reicht von Nukleotid 148 bis 168 (entsprechend Aminosäure 50 bis 56, d.h. LASNRHT) in SEQ ID NO. 3/4.

Die Erfindung betrifft somit insbesondere rekombinante Nukleinsäuren, die für ein Polypeptid mit Antikörpereigenschaften kodieren, umfassend

(a) eine CDR3-VH-Sequenz kodierend für die Aminosäuresequenz (I):

D G S M G G F D Y

oder/und

(b) eine CDR-3-VL-Sequenz kodierend für die Aminosäuresequenz (II):

L Q H W N Y P Y T

Weiterhin betrifft die Erfindung rekombinante Polypeptide mit Antikörpereigenschaften umfassend

(a) eine CDR3-VH-Aminosäuresequenz (I):

D G S M G G F D Y

oder/und

(b) eine CDR-3-VL-Aminosäuresequenz (II):

L Q H W N Y P Y T

Die rekombinanten Nukleinsäuren und Polypeptide enthalten vorzugsweise die CDR3-Regionen sowohl der VH- als auch der VL-Sequenz. Besonders bevorzugt sind die rekombinanten Polypeptide einzelkettige Antikörper, z.B. scFv-Antikörperfragmente. Bei den rekombinanten Polypeptiden sind die nicht unmittelbar für die Antigenbindung verantwortlichen Framework-Domänen vorzugsweise durch entsprechend humane Sequenzen ersetzt, so daß humanisierte Antikörperfragmente entstehen. Die Erfindungs-

- 11 -

gemäßen rekombinanten Polypeptide können mit Effektorgruppen, d.h. cytotoxischen Gruppen für therapeutische Zwecke oder/und Nachweisgruppen für ein Tumorimaging gekoppelt sein.

5 Weiterhin wird die Erfindung durch die nachfolgenden Abbildungen und Beispiele erläutert. Es zeigen:

Abbildung 1: Eine schematische Darstellung des "Scannens" einer Zelle im Lasermikroskop.

- 10 a) Von einer ca. 15 μm großen Tumorzelle werden insgesamt 30 Serienschnitte im Abstand von jeweils 0,5 μm angelegt.
- b) Die Messung der Fluoreszenz wird in jeder Schnittebene durchgeführt und dann alle Fluoreszenzwerte addiert.
- 15 c) Anhand einer Standardkurve (Latex-Mikropartikel mit definierter Fluorochrommenge) erfolgt eine Berechnung der Gesamtfluoreszenz.

Abbildung 2: das Ergebnis der Fluoreszenzanfärbung einer Tumorzelle mit dem Anti-Cytokeratin-Antikörper A45 B/B3 und Alexa 488 als Fluoreszenzfarbstoff.

20

- a) Die Bildsequenz zeigt 24 Aufnahmen einer Scanprozedur, bei der eine ca. 12 μm große Mammakarzinomzelle (ZR75) in Schnittebenen von jeweils 0,5 μm Abstand vermessen wurde.
- 25 b) Es ist eine "extended focus"-Aufnahme gezeigt, bei der die Gesamtintensität des gesamten Scans (a) auf eine einzige Bildebene projiziert wurde.

25

30 Abbildung 3: das Ergebnis einer indirekten Fluoreszenzanfärbung mit A45B/B3 als Primärantikörper und in Kombination mit Alexa 488 konjugierten Sekundärantikörper (Vergrößerung x63),

- 12 -

- a) Transmissionsbild
- b) eine Cytokeratin-positive Zelle im Knochenmarkausstrich einer Patientin mit Mammakarzinom.

- 5 **Abbildung 4:** das Ergebnis einer direkten Fluoreszenzanfärbung mit einem Konjugat des Antikörpers A45B/B3 und dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa 488 (Vergrößerung x63),
- a) Transmissionsbild
 - b) Cytokeratinnachweis in einer Mischpräparation aus MCF7-Tumorzellen und peripheren Blutlymphozyten (1:20)
- 10

- 15 **Abbildung 5:** das Ergebnis einer direkten Fluoreszenzanfärbung mit einem Konjugat des Anti uPAR-Antikörpers IIIF10 und dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa 568 (Vergrößerung x63),
- a) Transmissionsbild
 - b) uPA-Rezeptornachweis in einer Mischpräparation aus MCF 7-Tumorzellen und peripheren Blutlymphozyten (1:20)
- 20

- 25 **Abbildung 6:** das Ergebnis einer direkten Doppelfluoreszenzanfärbung mit den Konjugaten A45 B/B3-Alexa 488 (Anti-Cytokeratin) und IIIF10-Alexa 568 (Anti-uPAR),
- a) Transmissionsbild
 - b) Cytokeratinnachweis
 - c) uPA-Rezeptornachweis

- 30 **Abbildung 7:** das Ergebnis der Vermessung einer Tumorzelle im Knochenmark (Vergrößerung x 63),
- a) Transmissionsbild (Nomarski-Optik)

- 13 -

- b) Reaktion der Zelle mit einem Konjugat aus Alexa 488 und einem Anti-Cytokeratinantikörper
- c) Reaktion der Zelle mit einem Konjugat aus Alexa 568 und einem uPAR-Antikörper. Der Zellkern ist nicht gefärbt. Die Reaktion des Anti-uPAR-Antikörpers beschränkt sich hauptsächlich auf die Zellmembran. Rechts unten ist eine uPAR-positive Knochenmarkszelle, welche negativ für Cytokeratin ist, dargestellt. Alle anderen Zellen sind uPAR-negativ.

5

10

- Abbildung 8: den Einfluß von uPA auf die uPAR Bestimmung
- a) das UPA/uPAR-Verhältnis in Tumorextrakten von 599 Mammakarzinompatientinnen
- b) die Bestimmung von uPAR in Gegenwart unterschiedlicher uPA-Mengen

15

- Abbildung 9: den uPAR-Antigengehalt in verschiedenen Zellen bestimmt durch unterschiedliche Testverfahren:
- IIIF10/HU277 schwarz, HD13.1/HU277: dunkelgrau, ADI hellgrau

20

- a) normale Zellen
- b) gut differenzierte Tumorzellen
- c) schlecht differenzierte Tumorzellen

25

- Abbildung 10: die prognostische Relevanz des uPAR-Antigengehalts bestimmt durch unterschiedliche Testverfahren an 203 Mammakarzinompatientinnen
- a) IIIF10/HU277
- b) HD13.1/HU277
- c) ADI

30

- 14 -

Abbildung 11: die dosisabhängige Inhibierung des Tumorwachstums von humanem Brustkrebs in Nacktmäusen bei Verabreichung des Antikörpers IIIF10.

5 Abbildung 12: die Bindung von scFv IIIF10 an immobilisierte Antigene.

Abbildung 13: die Hemmung der Bindung von IIIF10 (monoklonaler Antikörper/moab und scFv) an uPAR durch Peptide.

10 SEQ IN NO 1/2: die Nukleotidsequenz der für die VH-Kette von IIIF10 VH kodierenden cDNA und die korrespondierende Aminosäuresequenz.

15 SEQ ID NO 3/4: die Nukleotidsequenz der für die VL-Kette von IIIF10 kodierenden cDNA und die korrespondierende Aminosäuresequenz.

Beispiele

20 1. Doppelfluoreszenzbestimmung von Tumorzellen

1.1 Material

25 Der monoklonale Maus-Antikörper A45B/B3 (Kaspar et al., Eur. J. Cancer Clin. Oncol 23, (1987), 137-147) ist gegen die Cytokeratin-Filamente 8, 18 und 19 (CK 8,18,19) gerichtet. Dieser Antikörper wurde mit dem Fluorochrom ALEXA 488 von Molecular Probes direktkonjugiert. Der uPA-Rezeptor wird vom monoklonalen Maus-Antikörper IIIF10 (Luther et al. (1997), supra) (Epitop 52 bis 60) spezifisch detektiert. Als weitere uPA-Rezeptor-Antikörper
30 stehen die monoklonalen Antikörper HD 13.1 und II D7 (Luther et. al. (1997), supra) (Epitop 125 bis 132), sowie der polyklonale Kaninchenantikörper #399R (Stahl et. al., Cancer Res. 54 (1994), 3066-3071) und der

- 15 -

Hühnerantikörper HU277 (Magdolen et al., Electrophoresis 16 (1995), 813-816) zur Verfügung. Alle monoklonalen Antikörper gegen den uPA-Rezeptor wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff ALEXA® 568 direktkonjugiert.

5 Tabelle 1 Verwendete direktkonjugierte Antikörper

	Monoklonaler Antikörper	Antigen	Direktkonjugiert mit	Anregungsbereich im CLSM*	Hersteller
10	mAb II D 7 (Maus)	uPAR, Domäne 2	ALEXA 568 (™Molecular Probes)	568 nm	Pathologie Dresden und Frauenklinik München
	mAb III F 10 (Maus)	uPAR, Domäne 1	ALEXA 568 (™Molecular Probes)	568 nm	Pathologie Dresden und Frauenklinik München
15	mAb HD 13.1 (Maus)	uPAR, Domäne 2 + 3	ALEXA 568 (™Molecular Probes)	568 nm	Immunologie Heidelberg
	mAb A45 B/B 3 (Maus)	Cytokeratin 8/9/18	ALEXA 488 (™Molecular Probes)	488 nm	Micromet München

(*CLSM = konfokales Laser-Scanning-Mikroskop)

1.2 Knochenmarkpräparate

Im Operationssaal wird eine Jamshidi-Punktion durchgeführt. Beiderseits werden jeweils 4-6 ml Knochenmark aus den Beckenkammknochen entnommen. Die Anreicherung der Tumorzellen in der Fraktion der mononukleären Zellen erfolgt über einen Ficollgradienten. 8 bis 12 Cytospins (10⁶ Zellen pro Cytospin) werden pro Patient hergestellt. Nach Lufttrocknung werden die Präparate fixiert und permeabilisiert.

- 16 -

1.3 Fixierung und Permeabilisierung

1. Fixieren in 4% Paraformaldehyd (PFA) für 30 min.
2. Dreimal in Phosphat-gepufferter Salzlösung/Rinderserumalbumin (PBS/BSA) 1% waschen.
3. Permeabilisieren in 0,025% Saponin für 45 min.
4. Dreimal in PBS/BSA 1% waschen.

1.4 Doppelmarkierung von Cytokeratin und uPA-Rezeptor

1.4.1 Indirekte Methode

1. Inkubation über Nacht mit dem Primär-Maus-Antikörper A 45 B/B3 (Endkonzentration 0,004 mg/ml) in PBS/BSA 1% verdünnt.
2. Dreimal in PBS/BSA 1% waschen.
3. Inkubation mit dem zweiten in PBS/BSA 1% verdünnten Primär-Kaninchen-Antikörper #399 R (Endkonzentration 0,05 mg/ml) für 2 Stunden.
4. Dreimal in PBS/BSA 1% waschen
5. Sekundärantikörper Ziege-Anti-Maus-Alexa 488 (Endkonzentration 0,02 mg/ml) PBS/BSA 1% verdünnt, Inkubationszeit 30 min
6. Dreimal in PBS/BSA 1% waschen
7. Sekundärantikörper Ziege-Anti-Kaninchen-Alexa 568 (Endkonzentration 0,02 mg/ml) PBS/BSA 1% verdünnt, Inkubationszeit 30 min
8. Dreimal in PBS/BSA 1% waschen
9. Eindeckeln mit 5 µl PBS/BSA 1% und mikroskopieren

- 17 -

1.4.2 Direkte Method

1. Inkubation für 1 Stunde mit dem Antikörper A 45 B/B3-Alexa 488 (Endkonzentration 0,0014 mg/ml) in PBS/BSA 1% verdünnt.
2. Dreimal in PBS/BSA 1% waschen.
3. Inkubation über 1 Stunde mit dem Antikörper III F 10-Alexa 568 (Endkonzentration 0,003 mg/ml) in PBS/BSA 1% verdünnt.
4. Dreimal in PBS/BSA 1% waschen.
5. Eindeckeln mit 5 µl PBS/BSA 1% und mikroskopieren.

1.5 Quantifizierung

Die mit dem fluoreszierenden Antikörper reagierenden Antigene werden im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop bei einem Anregungsbereich von 488 nm bzw. 568 nm sichtbar. Durch Scannen der Zelle im Lasermikroskop, d.h. durch Durchschichten in 0,5 µm Schritten, werden Tumorzellen in 20 bis 30 Schnittebenen aufgeteilt. Alle Fluoreszenzen werden erfaßt, die Summe dieser Messungen wird errechnet. Anhand einer Standardkurve, die durch die Messung von Latexbeads mit einer definierten Menge an Fluoreszenzfarbstoff zuvor erstellt wurde, ist eine Quantifizierung der Antigene, die mit dem Antikörper reagiert haben, in der Tumorzelle möglich.

In Abbildung 1 ist das Prinzip der zur Lokalisierung und Quantifizierung der Fluoreszenzmarkierung verwendeten Scanning-Prozedur graphisch dargestellt. Die Abbildungen 2 bis 7 zeigen beispielhafte Ergebnisse für die praktische Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

2. Tumorspezifität des monoklonalen Antikörpers III F 10

Es wurden zwei verschiedene ELISA-Systeme für den Nachweis von uPAR-Antigen entwickelt:

- 18 -

- 1) Fängerantikörper: polyklonaler Hühnerantikörper HU277 (Magdoln et al. (1995), supra); Nachweisantikörper: Monoklonaler Antikörper IIIF10 (Luther et al. (1997), supra)
- 2) Fängerantikörper: polyklonaler Hühnerantikörper HU277; monoklonaler Antikörper HD13.1 (Todd et al. (1997), supra).

Diese ELISA-Systeme wurden mit einem kommerziell erhältlichen ELISA (ADI) für uPAR (American Diagnostica Inc. Greenwich, CT, USA) verglichen.

Die getesteten ELISA-Systeme wurden mit rekombinantem, in CHO-Zellen exprimierten, affinitätsgereinigten humanen uPAR (rec-uPAR) aufeinander eingestellt. Alle drei ELISA-Systeme zeigten gegenüber rec-uPAR eine vergleichbare Linearität und Sensitivität.

In fortführenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß der tatsächliche uPAR-Antigengehalt auf Zellen auch in Anwesenheit eines bis zu sechsfachen Überschusses von uPAR bestimmt werden kann. Die Wiederfindung war > 95% im Falle des IIIF10/HU277- und des HD13.1/HU277-Tests sowie > 80% im Falle des ADI-Tests. Das uPA/uPAR-Verhältnis in 599 analysierten Tumorextrakten ist typischerweise in 95% der Fälle < 3 (Tests mit ADI-UPA- und ADI-uPAR-ELISA). Diese Ergebnisse sind in Abbildung 8 gezeigt.

Anschließend wurden uPAR-Antigengehalte in Lysaten verschiedener Zelltypen bestimmt. Hier zeigte sich, daß die uPAR-Antigenbestimmung in nichtmalignen Zellen (z.B. Keratinozyten [HaCaT], Endothelzellen aus der Nabelschnur [HUVEC], epithelialen Zellen an der Mamma [HMEC]) vergleichbare Resultate mit allen drei ELISA-Systemen erbrachte. Bei Tumorzelllinien ergab sich hingegen ein deutlich anderes Bild. In gut differenzierten Mammakarzinomzellen erkannte lediglich der IIIF10/HU277 ELISA signifikante Mengen an Tumor-assoziiertem uPAR, während in schlecht differenzierten Mammakarzinomzelllinien der IIIF10/HU277- und der ADI-ELISA

- 19 -

vergleichbare Werte ergaben. Der HD13.1/HU277-ELISA detektierte sowohl bei gut als auch bei schlechtdifferenzierten Karzinomzellen zuwenig uPAR. Die Daten sind in Abbildung 9 gezeigt.

5 3. Prognostische Relevanz des monoklonalen Antikörpers III F10

10 In einer klinischen Studie wurde der uPAR-Antigengehalt mit allen drei in Beispiel 2 beschriebenen ELISA-Systemen in Tumorproben von über 200 Mammakarzinompatientinnen bestimmt. Hier zeigte sich, daß die mit dem III F10/HU277-ELISA gemessenen Antigenwerte eine signifikante prognostische Relevanz für den Krankheitsverlauf, d.h. für Rezidivfreiheit bzw. Versterben aufweisen. Mit den beiden anderen ELISA-Systemen konnte eine derartige prognostische Relevanz nicht gefunden werden. Die Daten sind in Abbildung 10 gezeigt.

15

4. In vivo Wirkung des monoklonalen Antikörpers III F10

20 4 bis 6 Wochen alten Balb/C/3 Nacktmäusen wurden an der rechten Flanke 6×10^6 humane Brustkrebszellen MDA-MB231 (Price et al., Cancer Res. 50 (1990), 717-721) in einem Gesamtvolumen von 300 μ l injiziert. Vor der Injektion wurden die Krebszellen mit jeweils 200 μ g des murinen monoklonalen Antikörpers III F10 in PBS, pH 7,4 vermischt. Anschließend wurden die Mäuse alle drei Tage mit monoklonalen Antikörper III F10 in einer Dosis von 2 mg/kg Körpergewicht bzw. 10 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal in einem Injektionsvolumen von 300 μ l behandelt. Das Volumen der in den Mäusen auftretenden Primärtumoren in cm^3 wurde nach vier Wochen durch Messung der beiden größten Durchmesser der Tumoren bestimmt. Den Kontrollmäusen wurde PBS, pH 7,4 verabreicht, jeder Gruppe bestand aus sechs Mäusen.

30

Die Ergebnisse sind in Abb. 11 gezeigt. Es ist zu erkennen, daß die Verabreichung des Antikörpers das Wachstum von Primärtumoren stark

- 20 -

verringerte. Die Inhibition des Wachstums war bei einer V rabreichung von 10 mg/kg Körperg wicht noch deutlicher als bei einer Verbreichung in einer Dosis von 2 mg/kg Körpergewicht ausgeprägt.

5. Herstellung von rekombinantem monoklonalem Antikörper IIIF10

mRNA von IIIF10 produzierenden Hybridomzellen wurde angereichert und in cDNA umgeschrieben. Die für die variablen Regionen der schweren (VH) und leichten (VL) Kette kodierenden cDNA-Fragmente wurden durch RT-PCR unter Verwendung genspezifischer Primer amplifiziert. Die VH- und VL-Gensegmente wurden in einen Phagemid-Vektor kloniert, um die Expression der variablen Regionen als einzelkettiger Antikörper (scFv) zu ermöglichen. Die scFv-Moleküle wurden durch Phagendisplay an der Oberfläche filamentöser Phagen als Fusionsprotein mit dem kleinen Phagenhüllprotein pIII präsentiert. Phagen, die eine funktionelle Expression von scFv-FIIIF10 zeigten, wurden durch spezifische Bindung von uPAR selektiert. Die selektierten Phagen wurden zur Infektion von E.coli Zellen verwendet, was die Produktion und Sekretion von löslichen scFv-Molekülen in das Kulturmedium ermöglichte. Abbildung 12 zeigt die Bindung des scFv-Überstands an einen auf einer Festphase immobilisierten uPAR. Die Bindefähigkeit der Antikörper scFv-Anti-X und scFv-Anti-Y wurde zu Kontrollzwecken mitgeführt.

Um die Bindespezifität weiter zu testen, wurden Peptide eingesetzt, die zur Kartierung des Epitops des Antikörpers IIIF10 verwendet worden waren (Luther et al., J. Pathol 150 (1997), 1231-1244). Wie aus Abbildung 13 ersichtlich ist, kann nur ein Peptid, dessen Sequenz das vollständige IIIF10 Epitop auf uPAR (51-65) umfaßt, die Bindung des monoklonalen Antikörpers und von scFvIIIF10 an uPAR zu verhindern. Ein anderes Peptid mit einem unvollständigen Sequenzepitop (48 bis 59) ist um inen Faktor >100 wenig r wirksam. Keines der Peptide kann di Bindung eines Kontrollanti-körpers scFv-Anti-X an sein Zielprotein X verhindern.

- 21 -

Die Nukleotidsequenz der VH-cDNA und die korrespondierende Aminosäuresequenz sind in SEQ ID NO. 1/2 dargestellt. Die Nukleotidsequenz der VL-cDNA und die korrespondierende Aminosäuresequenz sind in SEQ ID NO. 3/4 dargestellt.

5

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Willex Biotechnology GmbH

<120> Diagnostischer und therapeutischer Einsatz von
Antikörpern gegen den Urokinase-Rezeptor

<130> 19116PEP

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 354

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Phagensequenz

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(354)

<400> 1

cag	gtg	caa	ctg	cag	cag	tca	gga	cct	gag	ttg	gtg	aag	cct	ggg	gct	48
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	
1			5					10						15		

tta	gtg	aag	ata	tcc	tgc	aag	gct	tct	ggt	tac	agt	ttc	aca	agc	tac	96
Leu	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr	
			20					25						30		

gat	ata	aat	tgg	gtg	aag	cgg	agg	cct	gga	cag	gga	ctt	gag	tgg	att	144
Asp	Ile	Asn	Trp	Val	Lys	Arg	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
			35					40						45		

gga	tgg	att	ttt	cct	gga	gat	ggt	agt	acc	aat	tac	aat	gag	aaa	ttc	192
Gly	Trp	Ile	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	
			50				55							60		

aag	gac	aag	gcc	aca	ctg	act	gct	gac	aaa	tcc	tcc	agc	aca	gcc	tac	240
Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	

65					70					75					80	
atg	cag	ctc	aac	agc	ctg	act	tct	gag	aac	tct	gca	gtc	tat	ttc	tgt	288
Met	Gln	Leu	Asn	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asn	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	

gca aga gat gga agt atg ggg ggg ttt gac tac tgg ggc caa ggg acc 336
Ala Arg Asp Gly Ser Met Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

acg gtc acc gtc tcc tca
Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

~~<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:~~
Phagensequenz

<400>.2

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Leu Val Lys Ile Ser Cys Lys-Ala Ser Gly Tyr Ser Phe-Thr Ser Tyr
20 25 30

Asp Ile Asn Trp Val Lys Arg Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asn Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg*Asp*Gly-Ser-Met-Gly Gly Phe-Asp-Tyr-Trp-Gly-Gln-Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

-24-

<210> 3
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 Phagensequenz

<400> 3
 gat gtt ttg atg acc caa act cca aaa ttc atg tcc aca tca gta gga 48
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag aat gtt cgt act act 96
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Arg Thr Thr
 20 25 30
 gta gcc tgg tat caa gag aaa cca ggg cag tct cct aaa gca ctg att 144
 Val Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45
 tac ttg gca tcc aac cgg cac act gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc 192
 Tyr Leu Ala Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 agt gga tct gga aca gat ttc act ctc acc att agc aat gtg caa tct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80
 gaa gac ctg gca gat tat ttc tgt ctg caa cat tgg aat tat ccg tac 288
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 acg ttc gga ggg ggc acc aag ctg gaa atc aaa cgg 324
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 4
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Phagensequenz

<400> 4

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Arg Thr Thr
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

Ansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Zellen in einer biologischen Probe
umfassend die Schritte:

5

- (a) Bereitstellen einer zu testenden Probe,
- (b) Inkontaktbringen der Probe mit mindestens zwei verschiedenen, die nachzuweisenden Zellen erkennenden Bindemolekülen, wobei die Bindemoleküle mit jeweils verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden, und
- (c) Bestimmen der Fluoreszenzmarkierungen in der auf einer Festphase fixierten Probe.

10

2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Tumorzellen nachweist.

15

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Nachweis in einer Knochenmarksprobe erfolgt.

20

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als zellspezifische Bindemoleküle Antikörper oder Antikörperfragmente oder/und Rezeptorliganden verwendet.

25

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß man ein erstes Cytokeratin-spezifisches Bindemolekül und ein
zweites Urokinaserezeptor-spezifisches Bindemolekül verwendet.

30

-27-

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch g gekennzeichnet,
daß die Bindemoleküle indirekt markiert werden.
- 5 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
~~dadurch gekennzeichnet,~~
daß die Bindemoleküle direkt markiert werden.
- 10 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Auswertung der Probe durch ein konfokales Laser-Scanning-
Mikroskop oder durch ein Fluoreszenzmikroskop erfolgt.
- 15 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
~~dadurch gekennzeichnet,~~
daß die Auswertung der Probe durch parallele oder/und sequentielle
Bestimmung der Fluoreszenz der verschiedenen Markierungsgruppen
erfolgt.
- 20 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, weiterhin umfassend
eine Charakterisierung von durch Reaktion mit den Bindemolekülen
identifizierten Zellen.
- 25 11. Verfahren nach Anspruche 10,
dadurch gekennzeichnet
daß die Charakterisierung eine ortsspezifische oder/und quantitative
Bestimmung der Fluoreszenzmarkierung umfaßt.
- 30 12. Reagenzienkit zum Nachweis von Zellen in einer biologischen Probe
umfassend
(a) ein erstes, die nachzuweisenden Zellen kennzeichnendes Bindemo-
lekül und eine erste Fluoreszenz-Markierungsgruppe,

-28-

(b) ein zweites, die nachzuweisenden Zellen erkennendes Bindemolekül und eine zweite Fluoreszenz-Markierungsgruppe, wobei das erste und das zweite Bindemolekül und die erste und die zweite Fluoreszenz-Markierungsgruppe verschieden sind und

5

(c) Mittel zur Fixierung von Zellen auf einer Festphase.

13. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 11 oder des Reagenzienkits nach Anspruch 12 zum Nachweis von Mikrometastasen in biologischen Proben.

10

14. Verwendung eines Antikörpers, der gegen das Epitop 52-60 des Urokinaserezeptors (uPAR) gerichtet ist, oder eines antigenbindenden Fragments davon zur Herstellung eines gegen uPAR auf Tumorzellen gerichteten diagnostischen oder therapeutischen Mittels.

15

15. Verwendung nach Anspruch 14 als diagnostisches Mittel zur Prognose des Verlaufs bei malignen Erkrankungen.

20

16. Verwendung nach Anspruch 14 als diagnostisches Mittel zum Nachweis von Tumorzellen in einer biologischen Probe.

17. Verwendung nach Anspruch 16 zum Nachweis von verstreuten Tumorzellen in Knochenmark.

25

18. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 17 in einem ELISA.

19. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 17 in einem Doppel-fluoreszenz-Nachweisverfahren.

30

20. Verwendung nach Anspruch 14 als therapeutisches Mittel zur Funktionsblockierung bei Tumorzellen.

-29-

21. Verwendung nach Anspruch 14 in Form eines Konjugats mit ein r cytotoxischen Gruppe zur Wachstumshehmung oder Abtötung von Tumorzellen.
- 5 22. Verwendung nach Anspruch 21,
~~dadurch gekennzeichnet,~~
daß die cytotoxische Gruppe ausgewählt wird aus radioaktiven Gruppen, Toxinen und Inhibitoren.
- 10 23. Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 22,
~~dadurch gekennzeichnet,~~
daß der Antikörper ausgewählt wird aus dem monoklonalen Antikörper III F10, Fragmenten davon oder Antikörpern und Antikörperfragmenten mit äquivalenter Bindespezifität.
- 15 24. Rekombinante Nukleinsäure, die für ein Polypeptid mit Antikörpereigenschaften kodiert, umfassend:
(a) eine CDR3-VH-Sequenz kodierend für die Aminosäuresequenz
(I):
20 D G S M G G F D Y
oder/und
(b) eine CDR-3-VL-Sequenz kodierend für die Aminosäuresequenz
(II):
L Q H W N Y P Y T
- 25 25. Rekombinantes Polypeptid mit Antikörpereigenschaften umfassend:
(a) eine CDR3-VH-Aminosäuresequenz (I):
D G S M G G F D Y
oder/und
30 (b) eine CDR-3-VL-Aminosäuresequenz (II):
L Q H W N Y P Y T

-30-

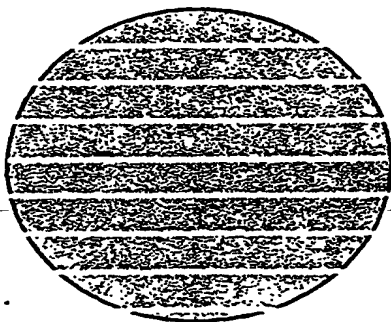
26. Rekombinantes Polypeptid nach Anspruch 25,
dadurch gekennzeichnet,
daß es ein scFv-Antikörper-Fragment ist.

5 27. Rekombinantes Polypeptid nach Anspruch 25 oder 26,
dadurch gekennzeichnet,
daß es ein humanisiertes Antikörperfragment ist.

10 28. Rekombinantes Polypeptid nach einem der Ansprüche 25 bis 27,
dadurch gekennzeichnet,
daß es an eine Effektorgruppe gekoppelt ist.

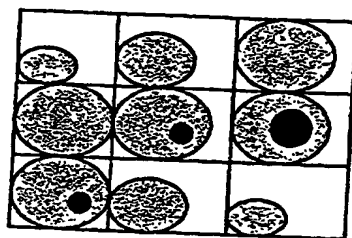
Abbildung 1

a

EPO - Munich
50

13. April 1999

b



c

Y Achse = Größe der Latexbeads

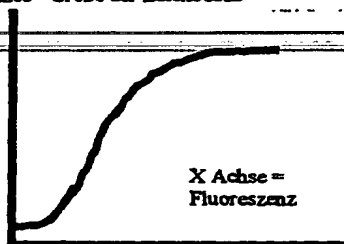
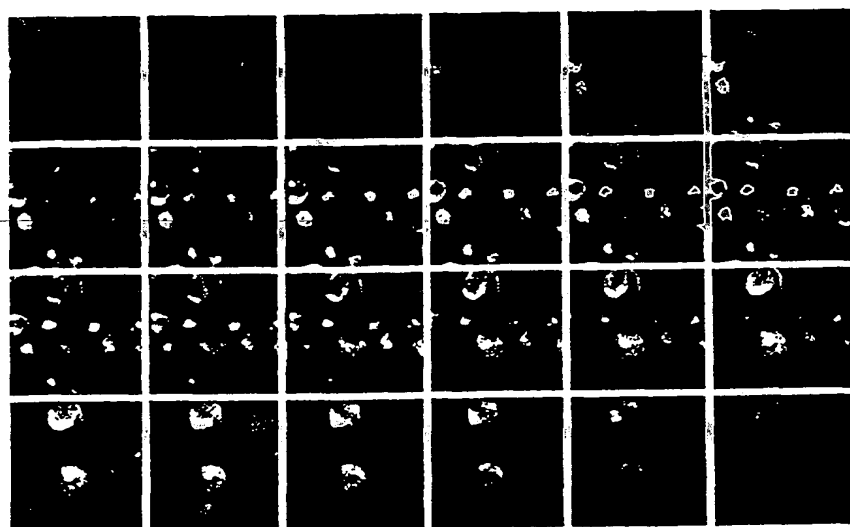


Abbildung 2

a



b

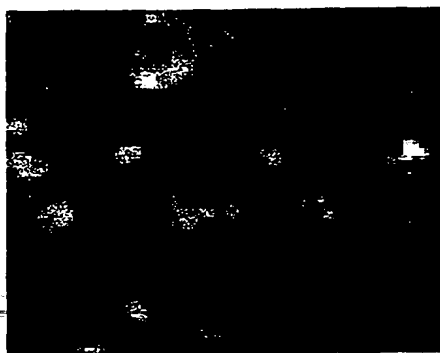
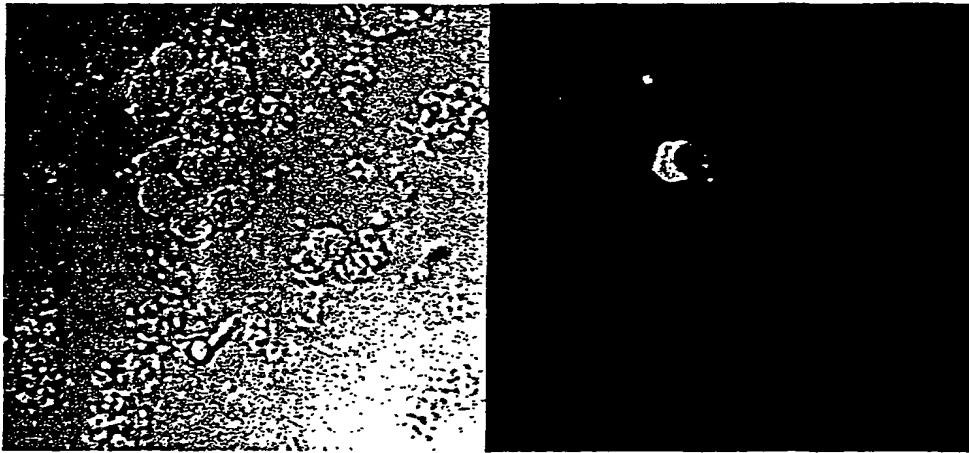


Abbildung 3

a



b

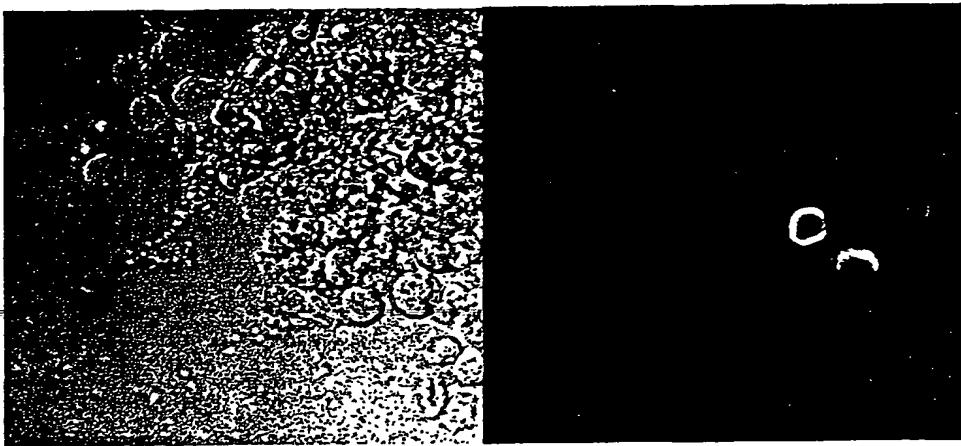
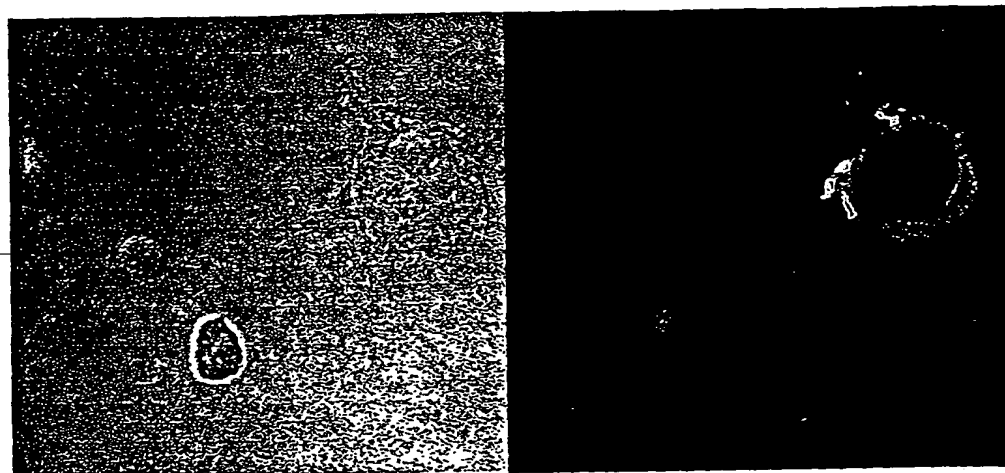


Abbildung 4

a



b

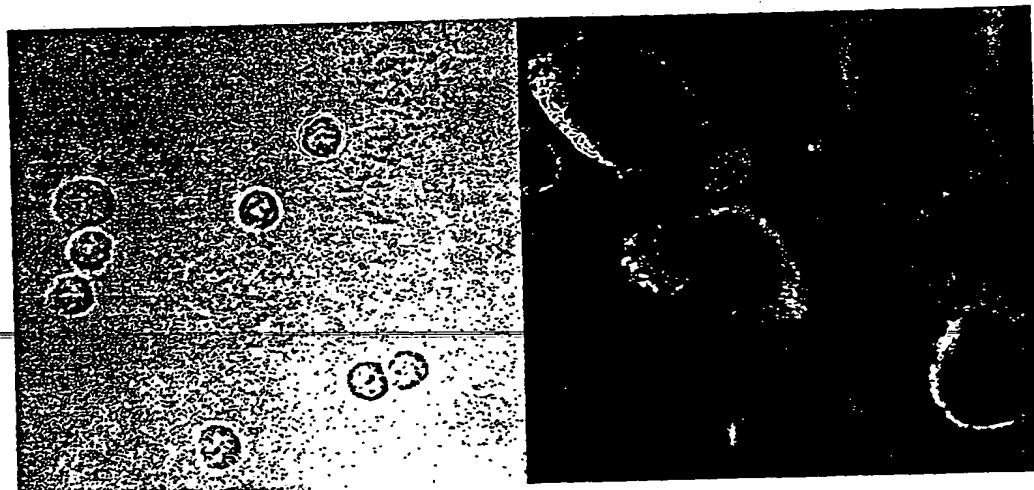
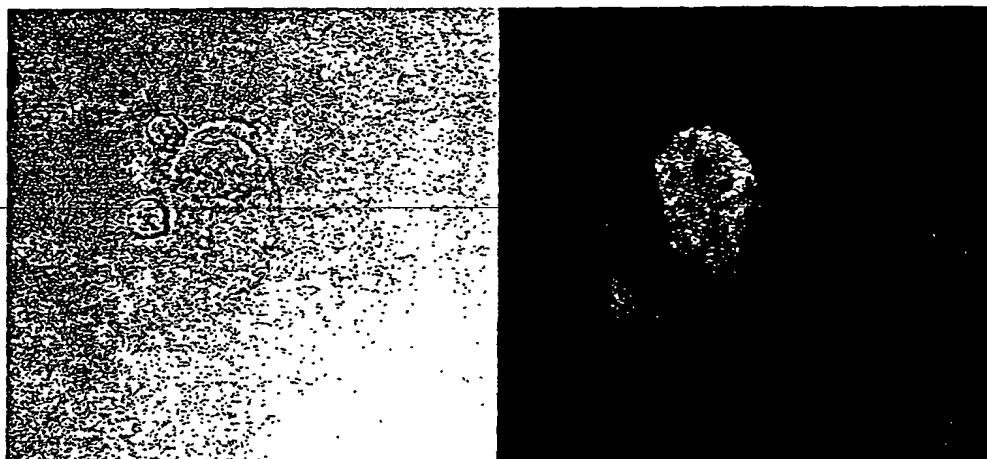


Abbildung 5

a



b

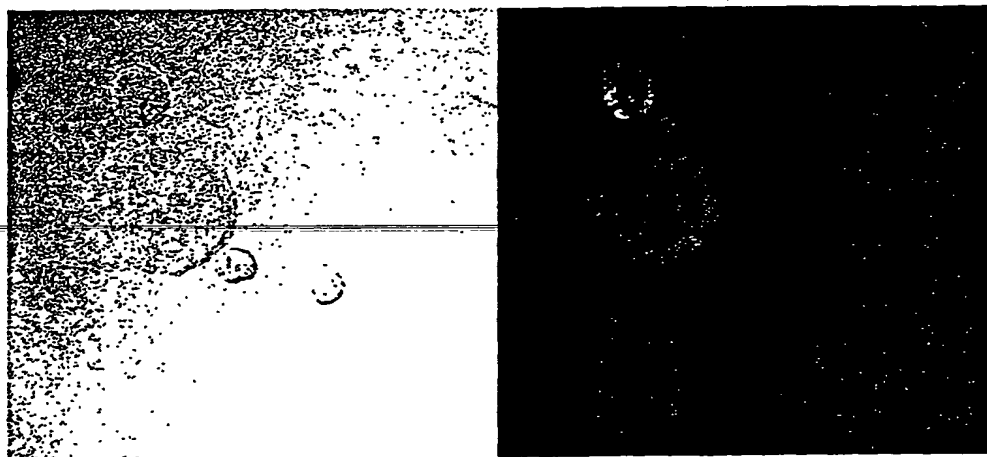
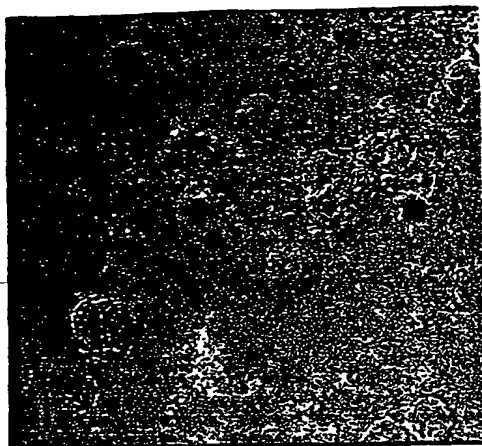
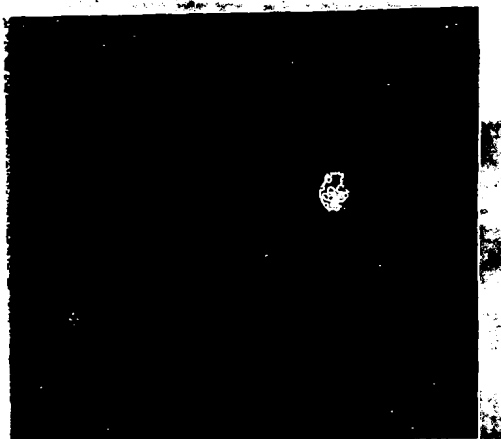


Abbildung 6

a



b



c

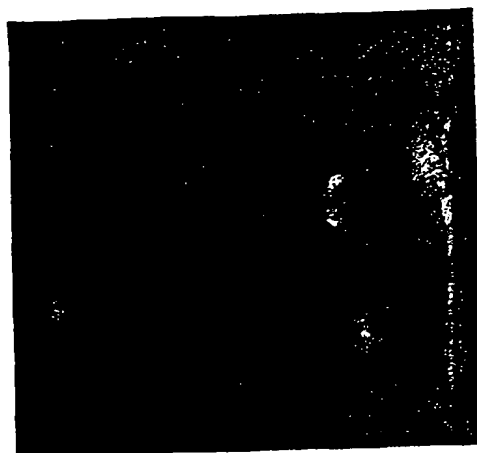
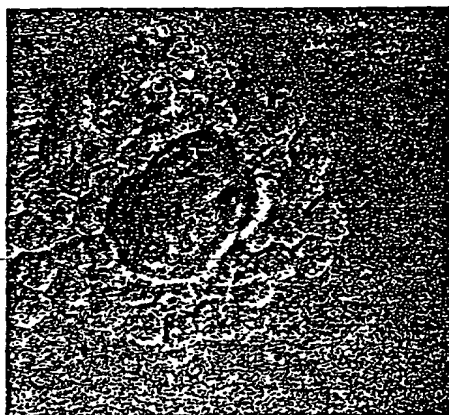
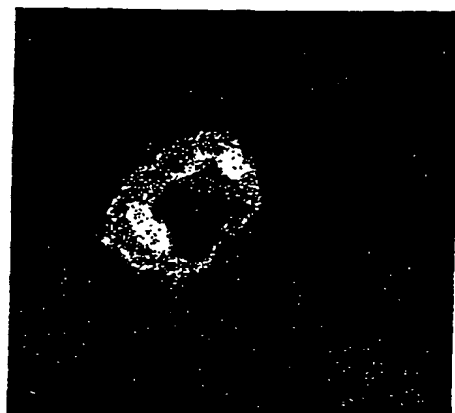


Abbildung 7

a



b



c

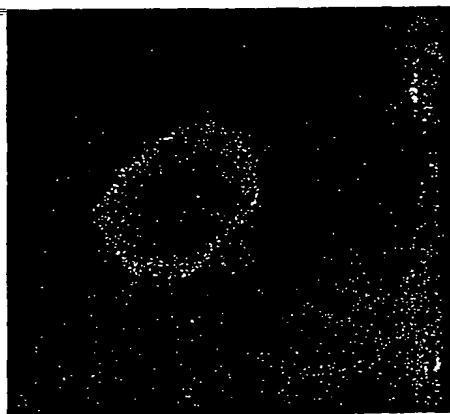


Abbildung 8

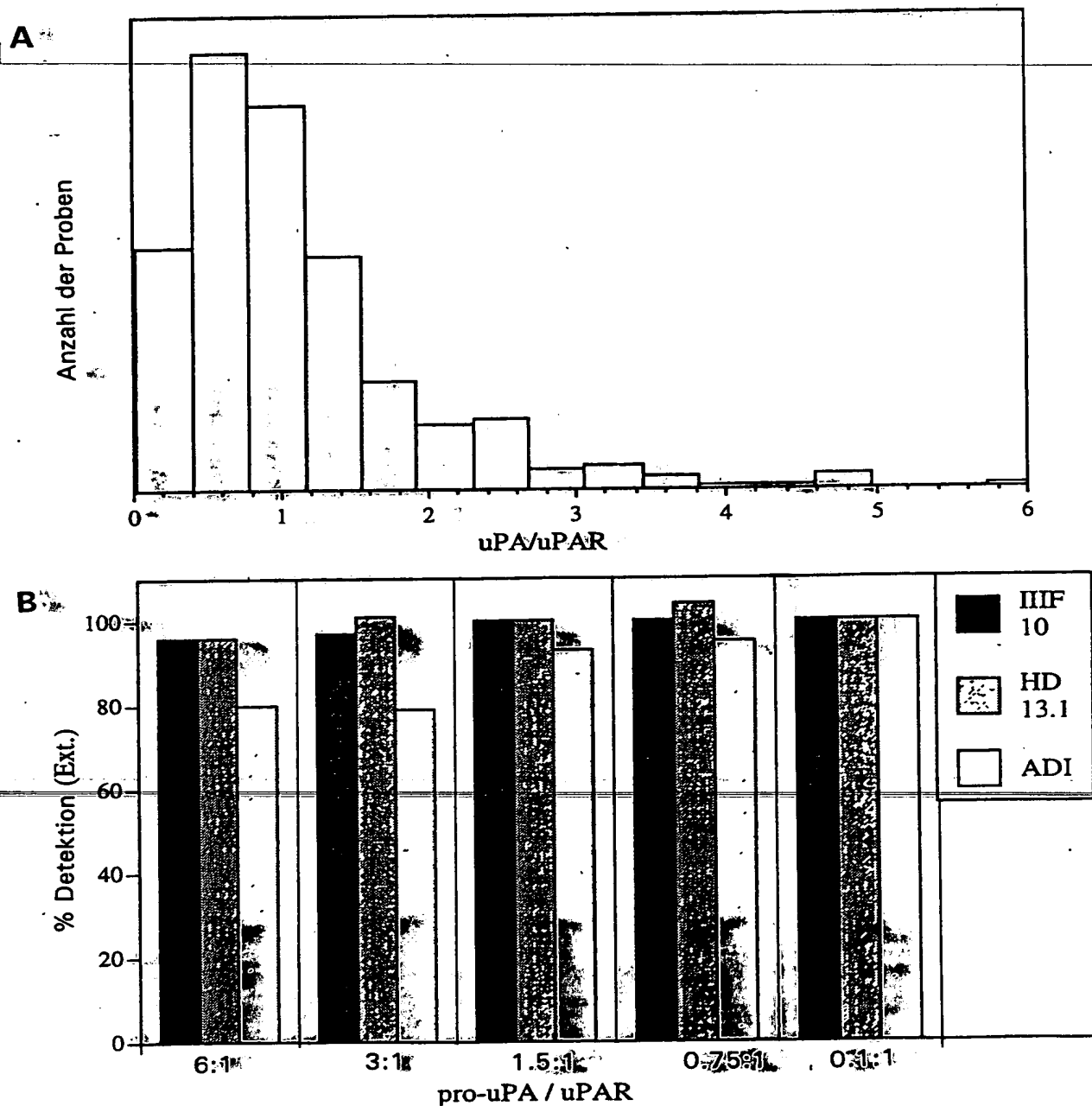


Abbildung 9

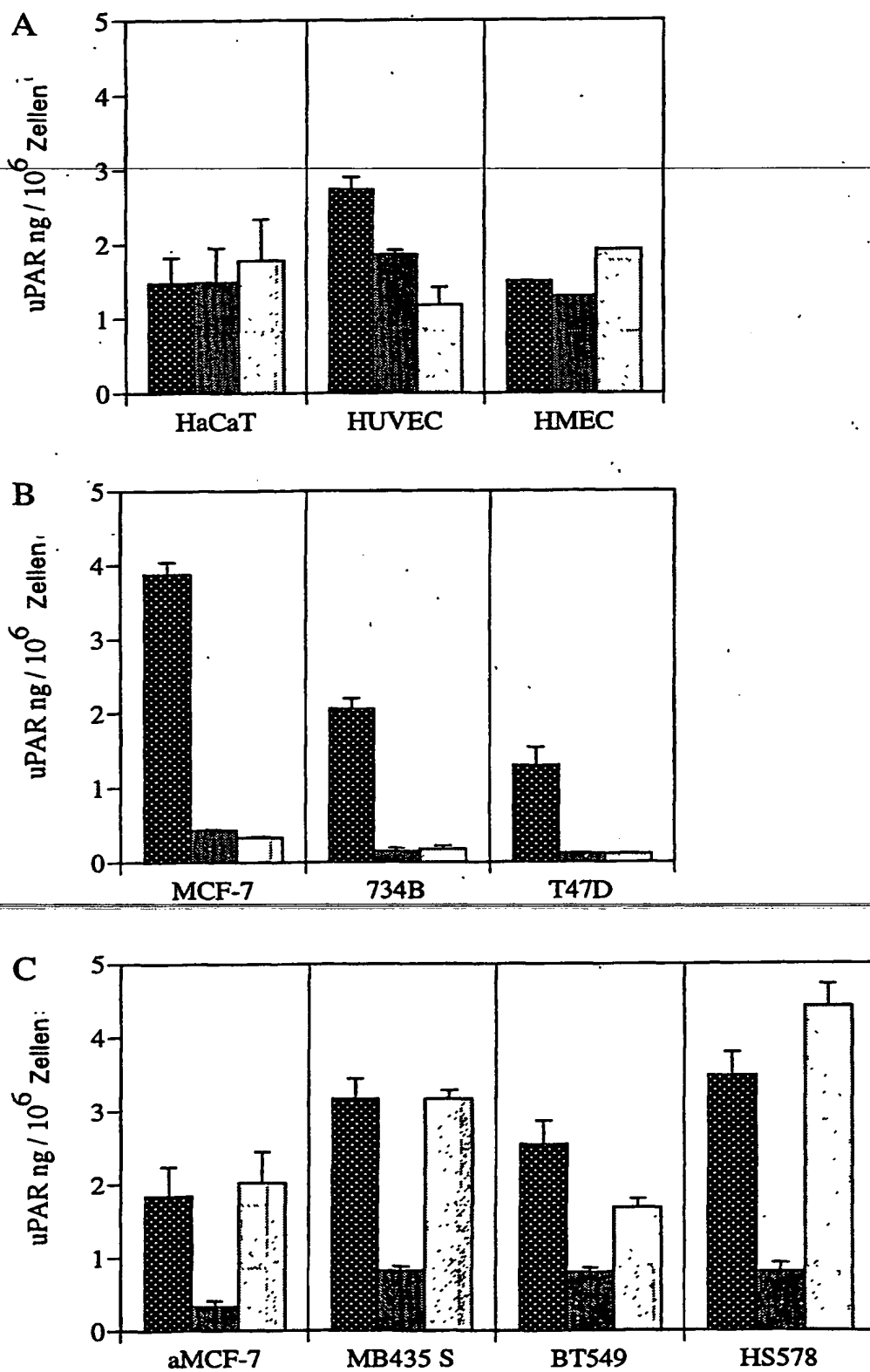
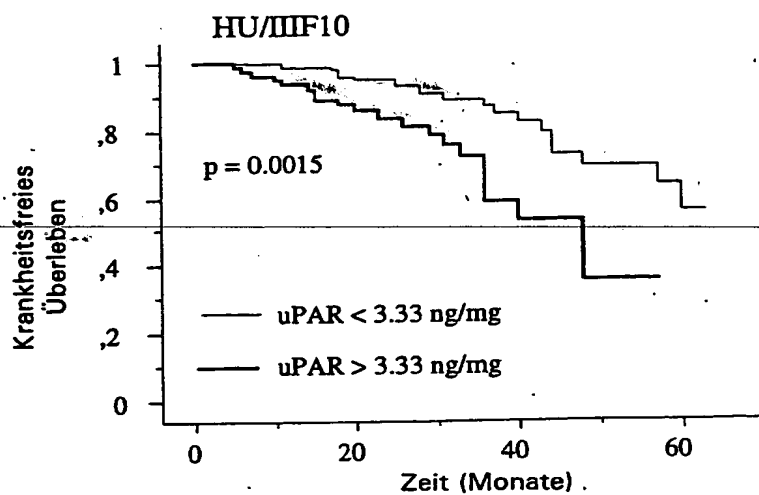
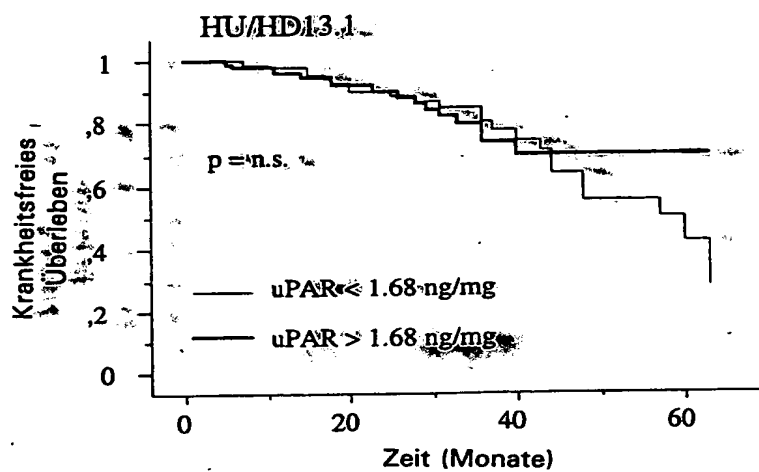


Abbildung 10

A



B



C

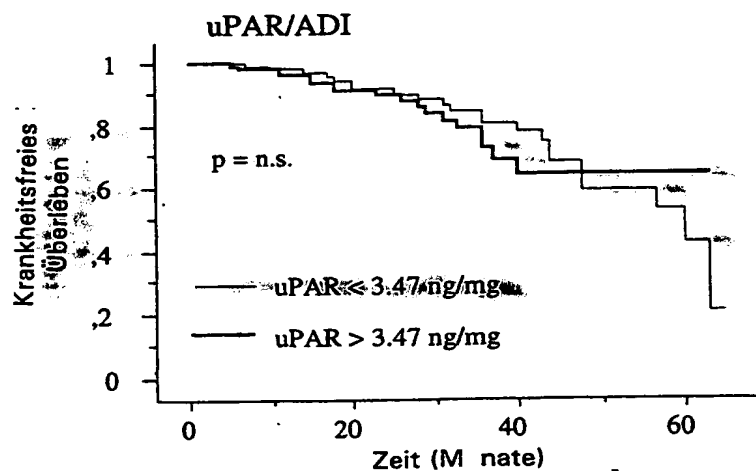


Abbildung 11

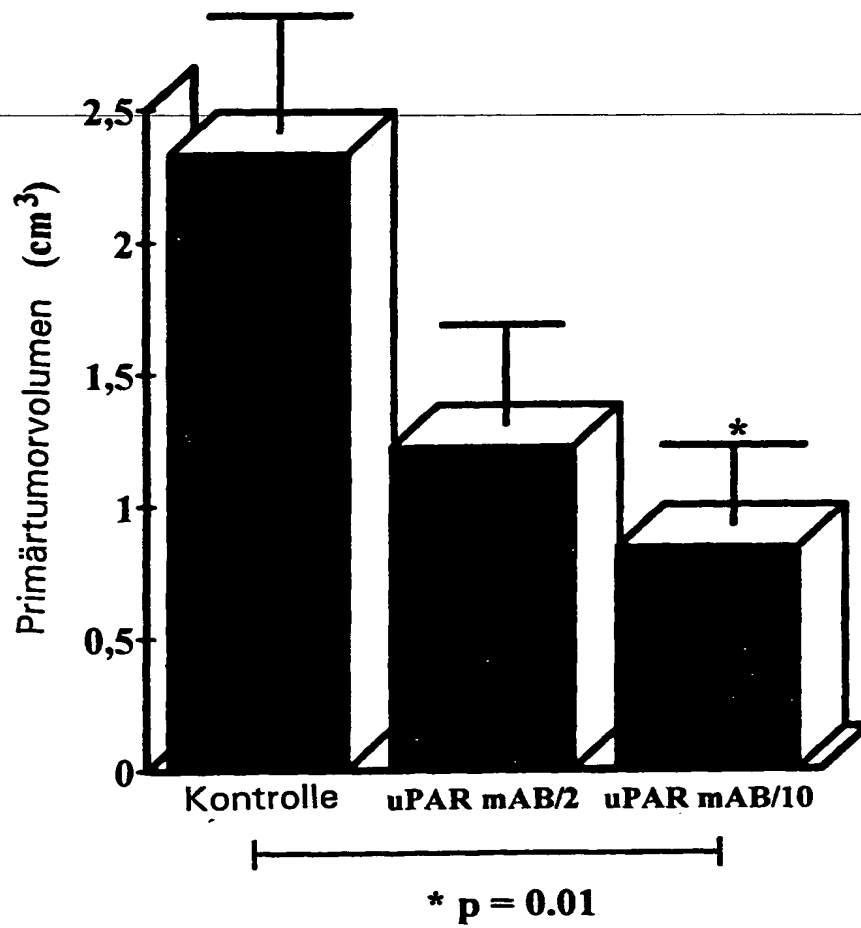


Abbildung 12

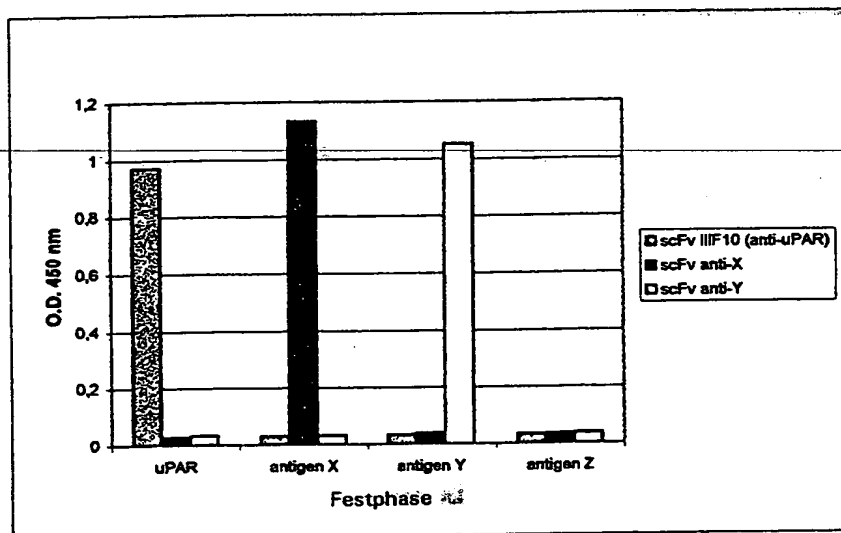
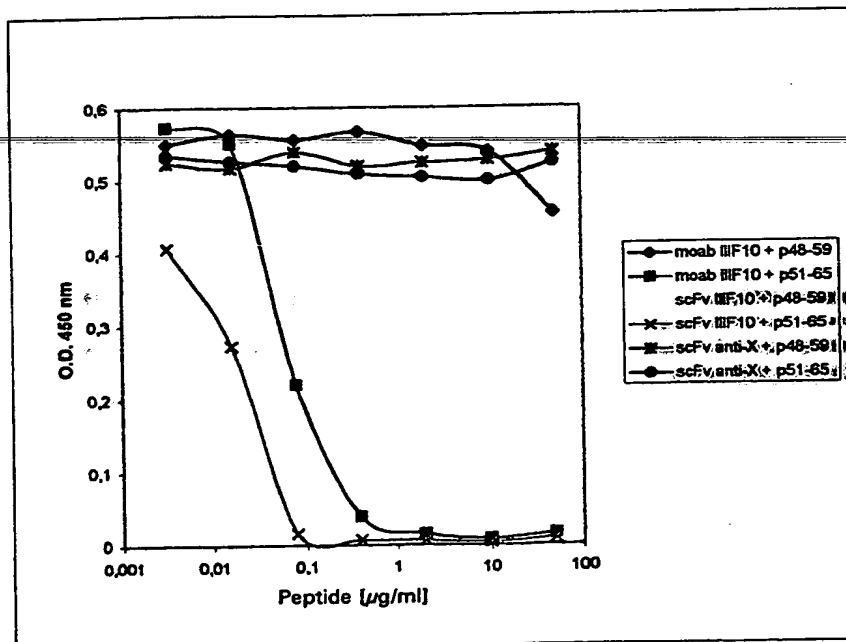


Abbildung 13



13. April 1999

-31-

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und einen Reagenzienkit zum Nachweis
5 von Zellen in einer biologischen Probe unter Verwendung einer Doppelfluoreszenztechnik sowie den diagnostischen und therapeutischen Einsatz
Aminosäuresequenz-spezifischer Antikörper gegen den Urokinaserezeptor
mit hoher Affinität für Tumorzell-exprimierten Rezeptor.

10

vo-12. April 1999

